

## Bawang merah goreng



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif .....	1
3 Istilah dan definisi .....	1
4 Komposisi .....	1
5 Syarat mutu .....	1
6 Pengambilan contoh.....	2
7 Cara uji .....	2
8 Syarat lulus uji .....	3
9 Higiene .....	3
10 Pengemasan .....	3
11 Syarat penandaan .....	3
Lampiran A (normatif) Cara uji bawang merah goreng.....	4
Bibliografi .....	43



## Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Bawang merah goreng* ini merupakan SNI baru. Standar ini disusun dengan tujuan sebagai berikut:

- Melindungi konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri bawang merah goreng dan industri pengguna bawang merah goreng.

Dalam merumuskan SNI ini tim telah memperhatikan ketentuan pada :

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 722/MENKES/PER/IX/1988, tentang Bahan Tambahan Makanan atau revisinya.
8. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang pada Kemasan Pangan dari Plastik.
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan Yang Baik ( *Good Manufacturing Practices* )
10. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No.HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
11. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No.HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemarkan Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67-04, Makanan dan Minuman Kementerian Perindustrian, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 19 Oktober 2010 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 27 April 2011 sampai 26 Juni 2011 dengan hasil akhir RASNI.



## Bawang merah goreng

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, komposisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji bawang merah goreng.

### 2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

### 3 Istilah dan definisi

#### 3.1

#### **bawang merah goreng**

produk olahan dari umbi tanaman bawang merah (*Allium ascalonicum* L. atau *Allium cepa* L.) yang dibuat dengan cara pengirisan dan penggorengan dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan

### 4 Komposisi

#### 4.1 Bahan baku

bawang merah

#### 4.2 Bahan pangan lain

bahan pangan yang diizinkan untuk bawang merah goreng sesuai dengan ketentuan yang berlaku

#### 4.3 Bahan tambahan pangan

bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk bawang merah goreng sesuai dengan ketentuan yang berlaku

### 5 Syarat mutu

Syarat mutu bawang merah goreng sesuai Tabel 1 di bawah ini.

**Tabel 1 – Syarat mutu bawang merah goreng**

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	normal
1.2	Warna	-	kuning hingga kuning kecoklatan
1.3	Rasa	-	normal



Tabel 1 (lanjutan)

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
2	Kadar air (b/b)	%	maks. 5
3	Abu tak larut asam (b/b)	%	maks. 0,1
4	Kadar lemak (b/b)	%	maks. 40
5	Asam lemak bebas (sebagai asam oleat (b/b))	%	maks 0,5
6	Cemaran logam		
6.1	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
6.2	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 7,0
6.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40
6.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
7	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,1
8	Cemaran mikroba		
8.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. $1 \times 10^4$
8.2	<i>Coliform</i>	koloni/g	maks. $1 \times 10^2$
8.3	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3
8.4	<i>Salmonella.sp</i>	-	negatif/25g
8.5	<i>Bacillus cereus</i>	koloni/g	maks. $1 \times 10^2$
8.6	<i>Clostridium perfringens</i>	koloni/g	maks. $1 \times 10^2$
8.7	Kapang dan khamir	koloni/g	maks. $2 \times 10^2$

## 6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

## 7 Cara uji

Cara uji untuk bawang merah goreng seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
  - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
  - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.2
  - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.3
- Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3
- Cara uji abu tak larut asam sesuai Lampiran A.4
- Cara uji kadar lemak sesuai Lampiran A.5
- Cara uji asam lemak bebas (sebagai asam oleat) sesuai Lampiran A.6
- Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.7
  - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.7.1
  - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.7.2
  - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.7.3
- Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.8



- i) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.9
- Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.9.1
  - Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.9.2
  - Cara uji *Coliform* sesuai Lampiran A.9.3
  - Cara uji *Escherichia coli* sesuai Lampiran A.9.4
  - Cara uji *Salmonella.sp* sesuai Lampiran A.9.5
  - Cara uji *Bacillus cereus* sesuai Lampiran A.9.6
  - Cara uji *Clostridium perfringens* sesuai Lampiran A.9.7
  - Cara uji kapang dan jamur sesuai Lampiran A.9.8

## 8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 5.

## 9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

## 10 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

## 11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



**Lampiran A**  
(normatif)  
**Cara uji bawang merah goreng**

**A.1 Persiapan contoh**

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

**A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi**

Buka kemasan contoh bawang merah goreng dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

**A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik**

Buka kemasan contoh bawang merah goreng dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

**A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia**

Buka kemasan contoh bawang merah goreng dan ambil contoh sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

**A.2 Keadaan**

**A.2.1 Bau**

**A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman (hidung) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

**A.2.1.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas kaca arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

**A.2.1.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika tercium bau khas bawang merah goreng, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium selain bau khas bawang merah goreng, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

**A.2.2 Warna**

**A.2.2.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan (mata) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.



**A.2.2.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas kaca arloji yang bersih dan kering;
- b) amati contoh uji untuk mengetahui warnanya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh tiga orang panelis yang terlatih atau satu orang tenaga ahli.

**A.2.2.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika berwarna kuning hingga kuning kecoklatan, maka hasil dinyatakan “kuning hingga kuning kecoklatan”; dan
- b) jika terlihat selain warna kuning hingga kuning kecoklatan, maka disebutkan warna yang diamati.

**A.2.3 Rasa****A.2.3.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

**A.2.3.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

**A.2.3.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan “normal”; dan
- b) jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan “tidak normal”.

**A.3 Kadar air****A.3.1 Prinsip**

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu  $(105 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

**A.3.2 Peralatan**

- a) Oven terkalibrasi dengan ketelitian  $1 ^\circ\text{C}$ ;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Desikator yang berisi desikan; dan
- d) Pinggan aluminium bertutup dengan diameter 40 mm sampai dengan 50 mm.

**A.3.3 Cara kerja**

- a) Panaskan pinggan aluminium beserta tutupnya dalam oven pada suhu  $(105 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 1 jam, kemudian dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang ( $W_0$ );
- b) masukkan 2 g sampai dengan 5 g contoh ke dalam pinggan, tutup, dan timbang ( $W_1$ );
- c) panaskan pinggan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup pinggan disamping pinggan di dalam oven pada suhu  $(105 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 3 jam setelah suhu oven  $(105 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;



- d) tutup pinggan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit, sehingga suhunya sama dengan suhu ruang, kemudian timbang ( $W_2$ );
- e) ulangi lagi pemanasan dengan oven selama 1 jam, dinginkan dan timbang lagi;
- f) ulangi proses ini sehingga perbedaan antara dua penimbangan kurang dari 1 mg;
- g) catat hasil penimbangan yang terendah;
- h) lakukan pekerjaan duplo; dan
- i) hitung kadar air dalam contoh.

#### A.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \left( \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \right) \times 100\%$$

##### Keterangan:

$W_0$  adalah bobot pinggan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

$W_1$  adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

$W_2$  adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

### A.4 Abu tidak larut dalam asam

#### A.4.1 Prinsip

Contoh uji diabukan pada suhu 550 °C, kemudian dilarutkan dengan HCl dan disaring sebagai abu yang tidak larut dalam asam.

#### A.4.2 Peralatan

- a) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Penangas air;
- d) Desikator berisi desikan;
- e) Cawan porselen/silika volume 30 ml – 50 ml; dan
- f) Kertas saring tidak berabu dengan *particle retention* 2,5 µm.

#### A.4.3 Pereaksi

- a) Larutan asam klorida, HCl (2 : 5); dan
- b) Larutan perak nitrat, AgNO<sub>3</sub>.

#### A.4.4 Cara kerja

- a) Masukkan cawan ke dalam tanur pada suhu 550 °C selama 30 menit, kemudian dinginkan dengan desikator dan timbang ( $W_0$ );
- b) timbang secara seksama 2 g contoh ( $W_1$ ) ke dalam cawan porselen/silika/platina yang sudah diketahui bobotnya;
- c) panaskan dalam tanur pada suhu 550 °C selama 30 menit;



- d) teteskan sedikit air, uapkan hingga mengering, kemudian masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 550 °C sampai diperoleh abu berwarna putih;
- e) bila pada tahap (c) abu sudah berwarna putih, dinginkan, tambahkan 25 ml larutan HCl, tutup dengan kaca arloji, dan panaskan dalam penangas air selama 5 menit;
- f) dinginkan dan selanjutnya saring dengan kertas saring;
- g) cuci residu dengan air panas sehingga hasil saringan bebas dari HCl yang diuji dengan larutan perak nitrat;
- h) simpan dan masukkan kertas saring dan residu dalam cawan;
- i) abukan dalam tanur pada suhu 550 °C, dinginkan dalam desikator dan timbang;
- j) ulangi lagi pengabuan, dinginkan dan timbang lagi;
- k) ulangi proses ini sehingga perbedaan antara dua penimbangan kurang dari 1 mg;
- l) catat hasil penimbangan yang terendah ( $W_2$ );
- m) lakukan pekerjaan duplo; dan
- n) hitung kadar abu tidak larut asam dalam contoh.

#### A.4.5 Perhitungan

$$\text{Abu tidak larut dalam asam (\%)} = \left( \frac{W_2 - W_0}{W_1} \right) \times 100\%$$

##### Keterangan:

$W_0$  adalah bobot cawan kosong, dinyatakan dalam gram (g);

$W_1$  adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

$W_2$  adalah bobot cawan + abu, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.4.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil abu tak larut asam. Jika kisaran lebih besar dari 10 %, maka uji harus diulang kembali.

### A.5 Kadar lemak

#### A.5.1 Prinsip

Contoh yang sudah dikeringkan diekstraksi dengan petroleum eter. Ekstrak petroleum eter yang diperoleh kemudian diuapkan sampai kering dan kadar lemak dihitung secara gravimetri.

#### A.5.2 Peralatan

- a) Alat Soxhlet lengkap;
- b) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,000 1 g;
- d) Desikator yang berisi desikan;
- e) Labu lemak 250 ml; dan
- f) *Thimble* ekstraksi atau selongsong kertas saring ukuran (33 x 80) mm.

#### A.5.3 Bahan dan Pereaksi

- a) Petroleum eter;
- b) Pasir;
- c) Kapas; dan
- d) Batu didih



#### A.5.4 Cara kerja

- Timbang 2 g sampai dengan 4 g contoh ke dalam *thimble* ( $W_0$ );
- keringkan labu lemak yang berisi beberapa butir batu didih selama 1 jam;
- dinginkan dalam desikator dan timbang ( $W_1$ ), sambungkan dengan alat *Soxhlet*;
- masukkan *thimble* ekstraksi atau selongsong kertas saring ke dalam *Soxhlet* (sebaiknya *thimble* ditopang *glass bead*), kemudian tuangkan petroleum eter sebanyak 2/3 kapasitas labu di atas penangas;
- Ekstrak contoh dengan pelarut petroleum eter selama 6 jam dengan alat *Soxhlet*;
- uapkan di atas penangas air sampai pelarut menguap semuanya dan tertinggal residu lemak;
- keringkan labu lemak beserta lemak di dalam oven pada suhu 95 °C sampai dengan 100 °C selama 30 menit;
- dinginkan dalam desikator dan timbang ( $W_2$ ); dan
- ulangi pengeringan dan penimbangan dengan interval 30 menit sampai berat konstan (biasanya dibutuhkan 1 jam sampai dengan 1,5 jam); dan
- hitung kadar lemak dalam contoh.

#### A.5.5 Perhitungan

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \left( \frac{W_2 - W_1}{W_0} \right) \times 100 \%$$

**Keterangan:**

$W_0$  adalah bobot contoh uji, dinyatakan dalam gram (g);

$W_1$  adalah bobot labu lemak kosong, dinyatakan dalam gram (g);

$W_2$  adalah bobot labu lemak kosong dan lemak, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan (duplo) maksimal 2 % dari nilai rata-rata hasil lemak. Jika kisaran lebih besar dari 2 %, maka uji harus diulang kembali.

### A.6 Asam lemak bebas (dihitung sebagai asam oleat)

#### A.6.1 Prinsip

Pelarutan contoh dalam pelarut organik dan dinetralkan dengan larutan basa (kalium hidroksida atau natrium hidroksida).

#### A.6.2 Peralatan

- Alat *Soxhlet* lengkap;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas air;
- Buret 10 ml atau 50 ml, terkalibrasi; dan
- Erlenmeyer kapasitas 250 ml.

#### A.6.3 Pereaksi

- Petroleum eter;
- Etanol netral;



etanol 95 % ditambah dengan beberapa tetes indikator pp dan di titar dengan NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda.

- c) Indikator fenolftalein (pp) 1 %; dan  
larutkan 1 g fenolftalein dengan etanol 95 % ke dalam labu ukur 100 ml kemudian tepatkan sampai tanda garis.
- d) Larutan kalium hidroksida, KOH 0,1 N atau Larutan natrium hidroksida, NaOH 0,1 N dalam etanol yang telah distandardisasi.

#### A.6.4 Cara kerja

- a) Ekstrak 10 g contoh (W) dengan pelarut petroleum eter selama 6 jam dengan alat Soxhlet;
- b) uapkan di atas penangas air sampai pelarut menguap semuanya dan tertinggal residu lemak;
- c) larutkan dengan 50 ml etanol netral;
- d) tambahkan 2 ml larutan fenolftalein sebagai indikator; dan
- e) titrasi larutan tersebut dengan KOH 0,1 N atau NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda.

#### A.6.5 Perhitungan

$$\text{Asam lemak bebas (sebagai asam oleat) (\%)} = \left( \frac{V \times N \times 28,2}{W} \right) \times 100 \%$$

##### Keterangan:

- V adalah volume KOH atau NaOH yang diperlukan dalam penitaran contoh, dinyatakan dalam mililiter (ml);
- N adalah normalitas larutan KOH atau NaOH, dinyatakan dalam normal (N);
- W adalah bobot contoh yang diuji, dinyatakan dalam gram (g);

#### A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan (duplo) maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil asam lemak bebas. Jika kisaran lebih besar dari 10 %, maka analisis harus diulang kembali.

### A.7 Cemaran logam

#### A.7.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

##### A.7.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

##### A.7.1.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;



- f) Pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- g) Labu ukur 1 000 ml, 100 ml, dan 50 ml, terkalibrasi;
- h) Gelas ukur 10 ml;
- i) Gelas piala 250 ml;
- j) Botol polipropilen;
- k) Cawan porselen/platina/kuarsa 50 ml sampai dengan 100 ml; dan
- l) Kertas saring tidak berabu dengan *particle retention* 20  $\mu\text{m}$  sampai dengan 25  $\mu\text{m}$ .

#### A.7.1.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- b) Asam klorida,  $\text{HCl}$  pekat;
- c) Larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  0,1 N;  
encerkan 7 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 ml sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  6 N;  
encerkan 500 ml  $\text{HCl}$  pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 ml sampai tanda garis.
- e) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/ml}$  Cd;  
larutkan 1 000 g Cd dengan 7 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 ml kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis, atau bisa digunakan larutan baku Cd 1 000  $\mu\text{g/ml}$  siap pakai.
- f) Larutan baku 200  $\mu\text{g/ml}$  Cd;  
pipet 10 ml larutan baku 1 000  $\mu\text{g/ml}$  Cd ke dalam labu ukur 50 ml kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200  $\mu\text{g/ml}$  Cd.
- g) Larutan baku 20  $\mu\text{g/ml}$  Cd;  
pipet 10 ml larutan baku 200  $\mu\text{g/ml}$  Cd ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20  $\mu\text{g/ml}$  Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;  
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,5 ml, 1 ml; 2 ml; 4 ml; 7 ml dan 9 ml larutan baku 20  $\mu\text{g/ml}$  kemudian tambahkan 5 ml larutan  $\text{HNO}_3$  1 N atau  $\text{HCl}$  6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,2  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,4  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,8  $\mu\text{g/ml}$ ; 1,4  $\mu\text{g/ml}$  dan 1,8  $\mu\text{g/ml}$  Cd.
- i) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/ml}$  Pb;  
larutkan 1 000 g Pb dengan 7 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 ml kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis, atau bisa digunakan larutan baku Pb 1 000  $\mu\text{g/ml}$  siap pakai.
- j) Larutan baku 50  $\mu\text{g/ml}$  Pb; dan  
pipet 5,0 ml larutan baku 1 000  $\mu\text{g/ml}$  Pb ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50  $\mu\text{g/ml}$ .
- k) Larutan baku kerja Pb.  
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml dan 4 ml larutan baku 50  $\mu\text{g/ml}$  kemudian tambahkan 5 ml larutan  $\text{HNO}_3$  1 N atau  $\text{HCl}$  6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ; 1,0  $\mu\text{g/ml}$ ; 1,5  $\mu\text{g/ml}$  dan 2,0  $\mu\text{g/ml}$  Pb.

#### A.7.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (W) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa;



- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur pada suhu  $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$  sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes  $\text{HNO}_3$  pekat kira-kira 0,5 ml sampai dengan 3 ml;
- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu  $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$  kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan  $\text{HNO}_3$  pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml  $\text{HCl}$  6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan  $\text{HNO}_3$  0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan aquabides (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

#### A.7.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/ml}$ );  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);  
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.7.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

### A.7.2 Timah (Sn)

#### A.7.2.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan  $\text{HNO}_3$  dan  $\text{HCl}$  kemudian tambahkan  $\text{KCl}$  untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$ .

#### A.7.2.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian  $1 ^\circ\text{C}$ ;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;



- e) Penangas air;
- f) Labu ukur 1 000 ml, 100 ml dan 50 ml, terkalibrasi;
- g) Pipet ukur 10 ml dan 5 ml berskala 0,1 ml, terkalibrasi;
- h) Erlenmeyer 250 ml;
- i) Gelas ukur 50 ml; dan
- j) Gelas piala 250 ml.

#### A.7.2.3 Pereaksi

- a) Larutan kalium klorida, 10 mg/ml K;  
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 ml.
- b) Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- c) Asam klorida, HCl pekat;
- d) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/ml}$  Sn; dan  
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 ml HCl pekat dalam labu ukur 1 000 ml, tambahkan 200 ml air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) Larutan baku kerja Sn.  
pipet 10 ml HCl pekat dan 1,0 ml larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml. Tambahkan masing-masing 0 ml; 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml dan 2,5 ml larutan baku 1 000  $\mu\text{g/ml}$  Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/ml}$ ; 5  $\mu\text{g/ml}$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$ ; 15  $\mu\text{g/ml}$ ; 20  $\mu\text{g/ml}$  dan 25  $\mu\text{g/ml}$  Sn.

#### A.7.2.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g (W) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 ml, tambahkan 30 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dan biarkan 15 menit;
- b) panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- c) lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 ml sampai dengan 6 ml atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- d) angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 ml HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap  $\text{Cl}_2$  berhenti;
- e) tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 ml sampai dengan 15 ml;
- f) tambahkan 40 ml air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 ml, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 ml air suling (V);
- g) tambahkan 1,0 ml KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$ ;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh.



### A.7.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

**Keterangan:**

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/ml)  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);  
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

### A.7.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

## A.7.3 Merkuri (Hg)

### A.7.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.

### A.7.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Tabung destruksi;
- Labu destruksi 250 ml berdasar bulat;
- Labu ukur 1 000 ml, 500 ml, 100 ml, dan 50 ml terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 ml;
- Pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi; dan
- Gelas piala 500 ml.

### A.7.3.3 Bahan dan Pereaksi

- Larutan asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 M;
- Larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  7 M;
- Campuran  $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$  (1:1);
- Hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$  pekat;
- Larutan Natrium molibdat,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 %;
- Larutan pereduksi;  
 campurkan 50 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan 300 ml air suling dalam gelas piala 500 ml dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g  $\text{SnCl}_2$ . Pindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.



- g) Larutan Natrium borohidrida ( $\text{NaBH}_4$ );  
larutkan 3 g serbuk  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan air suling dalam labu ukur 500 ml.
- h) Larutan pengencer;  
masukkan 300 ml sampai dengan 500 ml air suling kedalam labu ukur 1 000 ml dan tambahkan 58 ml  $\text{HNO}_3$  kemudian tambahkan 67 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- i) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/ml}$  Hg;  
larutkan 0,135 4 g  $\text{HgCl}_2$  dengan kira-kira 25 ml air suling dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- j) Larutan baku 1  $\mu\text{g/ml}$  Hg;  
pipet 1 ml larutan baku 1 000  $\mu\text{g/ml}$  Hg ke dalam labu ukur 1 000 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/ml}$ .
- k) Larutan baku kerja Hg; dan  
pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; dan 2 ml larutan baku 1  $\mu\text{g/ml}$  ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,005  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ; dan 0,02  $\mu\text{g/ml}$  Hg.
- l) Batu didih.

#### A.7.3.4 Cara kerja

##### A.7.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 M, 20 ml  $\text{HNO}_3$  7 M, 1 ml larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 ml campuran  $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$  (1:1) melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 ml air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 ml air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 ml larutan di atas ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pekerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.



**A.7.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup**

- Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO<sub>3</sub>, 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

**A.7.3.5 Perhitungan**

$$\text{Kandungan merkuri (Hg), (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

**Keterangan:**

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/ml);  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);  
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);  
 fp adalah faktor pengenceran.

**A.7.3.6 Ketelitian**

Kisaran hasil dua kali ulangan (duplo) maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

**A.8 Cemarkan arsen (As)****A.8.1 Prinsip**

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As<sup>5+</sup> direduksi dengan KI menjadi As<sup>3+</sup> dan direaksikan dengan NaBH<sub>4</sub> atau SnCl<sub>2</sub> sehingga terbentuk AsH<sub>3</sub> yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

**A.8.2 Peralatan**

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;



- f) *Burner* atau *bunsen*;
- g) Labu *Kjeldahl* 250 ml;
- h) Labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 ml;
- i) Labu ukur 1 000 ml, 500 ml, 100 ml, dan 50 ml, terkalibrasi;
- j) Gelas ukur 25 ml;
- k) Pipet volumetrik 25 ml terkalibrasi;
- l) Pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- m) Cawan porselen 50 ml; dan
- n) Gelas piala 200 ml.

### A.8.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- b) Asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;
- c) Asam perklorat,  $\text{HClO}_4$  pekat;
- d) Ammonium oksalat,  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  jenuh;
- e) Hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$  pekat;
- f) Larutan Natrium borohidrida,  $\text{NaBH}_4$ ;  
larutkan 3 g  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 ml.
- g) Larutan Asam klorida,  $\text{HCl}$  8 M;  
larutkan 66 ml  $\text{HCl}$  pekat kedalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) Larutan Timah (II) klorida,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 %;  
timbang 50 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke dalam gelas piala 200 ml dan tambahkan 100 ml  $\text{HCl}$  pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan Kalium iodida,  $\text{KI}$  20 %;  
timbang 20 g  $\text{KI}$  ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) Larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  75 mg/ml;  
larutkan 3,75 g  $\text{MgO}$  dengan 30 ml  $\text{H}_2\text{O}$  secara hati-hati, tambahkan 10 ml  $\text{HNO}_3$ , dinginkan dan encerkan hingga 50 ml dengan air suling;
- k) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/ml}$  As;  
larutkan 1,3203 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dengan sedikit  $\text{NaOH}$  20 % dan netralkan dengan  $\text{HCl}$  atau  $\text{HNO}_3$  1 : 1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 000 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- l) Larutan baku 100  $\mu\text{g/ml}$  As;  
pipet 10 ml larutan baku As 1 000  $\mu\text{g/ml}$  ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100  $\mu\text{g/ml}$  As.
- m) Larutan baku 1  $\mu\text{g/ml}$  As; dan  
pipet 1 ml larutan baku As 100  $\mu\text{g/ml}$  ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/ml}$  As.
- n) Larutan baku kerja As;  
pipet masing-masing 1,0 ml; 2,0 ml 3,0 ml; 4,0 ml dan 5,0 ml larutan baku 1  $\mu\text{g/ml}$  As ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,02  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,03  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,04  $\mu\text{g/ml}$  dan 0,05  $\mu\text{g/ml}$  As.



#### A.8.4 Cara kerja

##### A.8.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) kedalam labu *Kjeldahl* 250 ml, tambahkan 5 ml sampai dengan 10 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dan 4 ml sampai dengan 8 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dengan hati-hati;
- setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan  $\text{HNO}_3$  pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- tambahkan 2 ml  $\text{HClO}_4$  70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan  $\text{HClO}_4$ , tambahkan lagi sedikit  $\text{HNO}_3$  pekat);
- dinginkan, tambahkan 15 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dan 5 ml  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  jenuh;
- panaskan sehingga timbul uap  $\text{SO}_3$  di leher labu;
- dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 25 ml larutan diatas dan tambahkan 2 ml  $\text{HCl}$  8 M, 0,1 ml  $\text{KI}$  20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ( $\text{NaBH}_4$ ) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung kandungan As dalam contoh.

##### A.8.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml  $\text{HNO}_3$ , 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 10 ml larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 ml, tambahkan 1 ml larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu  $450^\circ\text{C}$  ( $\pm 1$  jam);
- dinginkan, larutkan dengan 2,0 ml  $\text{HCl}$  8 M, 0,1 ml  $\text{KI}$  20% dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- siapkan  $\text{NaBH}_4$  dan  $\text{HCl}$  dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- tuangkan larutan baku kerja As 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,02  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,03  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,04  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,05  $\mu\text{g/ml}$  serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* atau *bunsen* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan As dalam contoh.



### A.8.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As), (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

**Keterangan:**

C adalah konsentrasi arsen dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/ml);

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

fp adalah faktor pengenceran.

### A.8.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

## A.9 Cemarkan mikroba

### A.9.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji angka lempeng total (ALT), *Coliform* dan *Escherichia coli*

#### A.9.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

#### A.9.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Pemanas listrik;
- Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Labu ukur 1 000 ml, 500 ml, 100 ml, dan 50 ml terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Labu erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 ml dan 1,0 ml terkalibrasi dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettor*;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting, dan spatula steril.

#### A.9.1.3 Larutan pengencer

*Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);*

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  34 g
- Air suling 500 ml

Larutkan bahan – bahan di atas dan atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 ml dengan air suling di labu ukur 1 000 ml. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer 1,25 ml larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 ml. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 ml dan tabung reaksi sebanyak 9 ml kemudian disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.



#### A.9.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 ml larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

#### A.9.2 Angka lempeng total

##### A.9.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

##### A.9.2.2 Peralatan

- Inkubator  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , terkalibrasi;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air bersirkulasi  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;
- Alat penghitung koloni;
- Tally register*;
- Botol pengencer 160 ml terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- Pipet ukur 1 ml steril dengan skala 0,1 ml dilengkapi *bulb* dan *pipettor*; dan
- Cawan Petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

##### A.9.2.3 Pembenihan dan pengencer

###### *Plate count agar (PCA)*

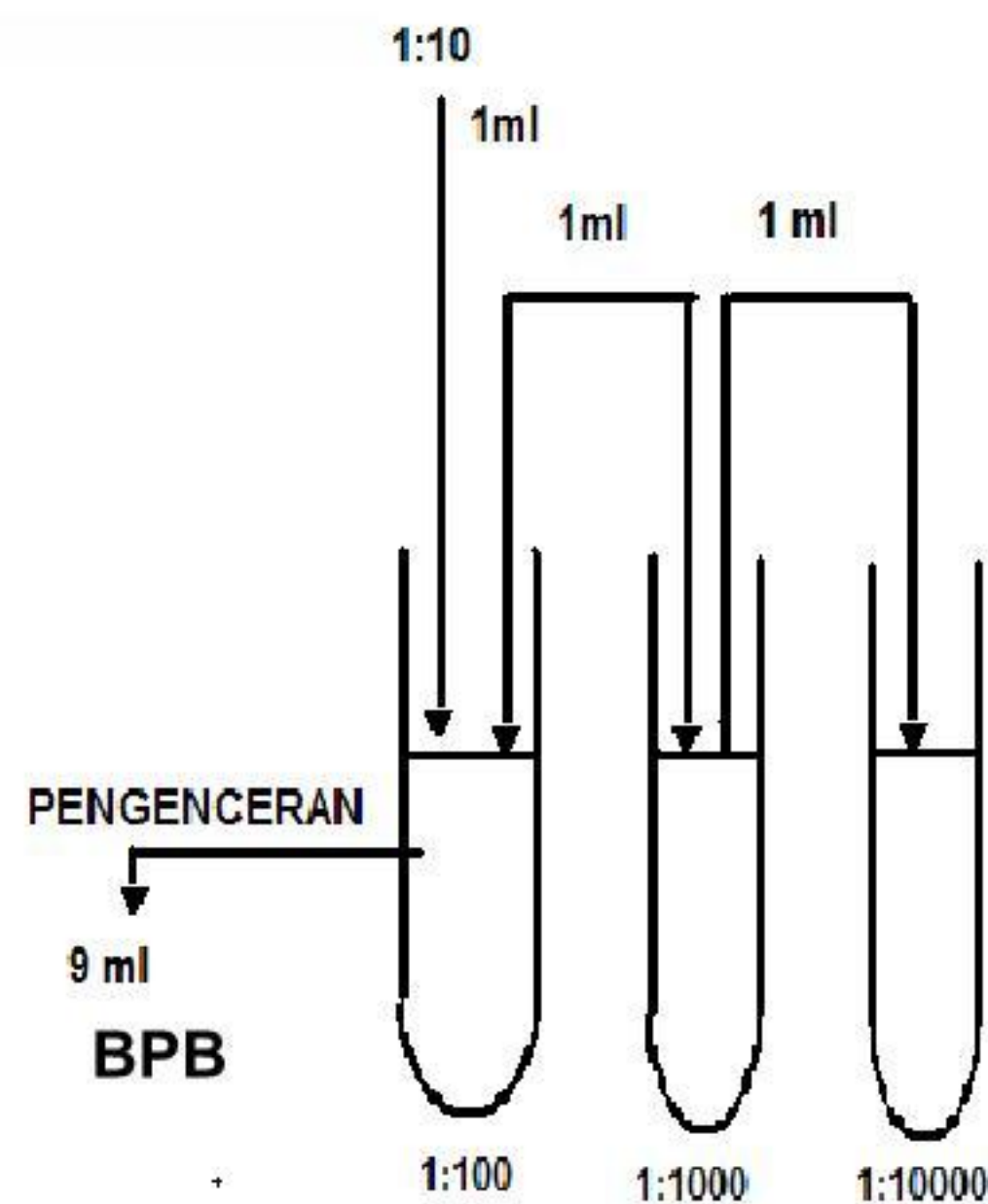
–	<i>Tryptone</i>	5 g
–	<i>Yeast extract</i>	2,5 g
–	Glukosa	1 g
–	Agar	15 g
–	Air suling	1 000 ml

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu  $121 ^\circ\text{C}$  selama 15 menit.



#### A.9.2.4 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar A.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB);



**Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB)**

- b) pipet masing-masing 1 ml dari tingkat pengenceran (F)  $10^{-1}$  sampai dengan  $10^{-4}$  ke dalam cawan Petri steril secara duplo;  
 c) tuangkan 12 ml sampai dengan 15 ml media PCA yang masih cair dengan suhu  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$  ke dalam masing-masing cawan Petri;  
 d) goyangkan cawan Petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;  
 e) kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;  
 f) biarkan sampai campuran dalam cawan Petri memadat;  
 g) masukkan semua cawan Petri dengan posisi terbalik ke dalam inkubator pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$  selama  $(48 \pm 2)$  jam; dan  
 h) catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan Petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 48 jam.

#### A.9.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) =  $n \times F$

##### Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);  
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

#### A.9.2.6 Pernyataan hasil

##### A.9.2.6.1 Cara menghitung

- a) Pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam cawan Petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;



- b) jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{\left[ (1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2} \right]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$ALT = \frac{\sum C}{\left[ (1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d \right]}$$

**Keterangan:**

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap Petri;  
 $n_1$  adalah jumlah Petri dari pengenceran pertama yang dihitung;  
 $n_2$  adalah jumlah Petri dari pengenceran kedua;  
d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{\left[ (1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2} \right]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing Petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640\,000 \text{ (} 6,4 \times 10^5 \text{)}$

- jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:  
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per  $\text{cm}^2$   
contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	area ( $\text{cm}^2$ )	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6\,500\,000 \text{ (} 6,5 \times 10^6 \text{)}$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5\,900\,000 \text{ (} 5,9 \times 10^6 \text{)}$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan Petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni yang merambat.  
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
  - perambatan yang terjadi diantara dasar cawan Petri dan pembenihan; dan
  - perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.



Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

#### A.9.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;  
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya  $5,3 \times 10^2$
- Jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan  
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya  $5,2 \times 10^2$
- Jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
  - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan  
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya  $5,8 \times 10^2$
  - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap  
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya  $5,6 \times 10^2$

### A.9.3 Coliform

#### A.9.3.1 Prinsip

Pertumbuhan *Coliform* setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu 35 °C, kemudian dilakukan uji penegasan menggunakan tabung BGLB *broth*.

#### A.9.3.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
- Pipet ukur 1 ml steril dengan skala 0,1 ml dilengkapi bulb dan pipettor; dan
- Cawan Petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

#### A.9.3.3 Perbenihan, pengencer dan pereaksi

- Violet red bile agar* (VRBA);
 

- yeast extract	3	g
- pepton atau <i>gelysate</i>	7	g
- sodium klorida	5	g
- garam <i>bile</i> no.3	1,5	g
- laktosa	10	g
- <i>neutral red</i>	0,03	g
- <i>crystal violet</i>	0,002	g
- agar	15	g
- air suling	1000	ml

Masukkan bahan-bahan di atas ke dalam 1 000 ml air suling, panaskan sampai mendidih hingga semua bahan larut. Sterilkan pada suhu 121 °C, selama 5 menit dan tepatkan pH akhir (7,4±0,2).

- brilliant green lactose bile* (BGLB) *broth* 2 %; dan
- tryptic soy agar*.

#### A.9.3.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.9.1;



- b) inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  dan  $10^{-4}$  ke dalam cawan Petri dan tuang dengan 10 ml VRBA bersuhu  $48^{\circ}\text{C}$ , kemudian goyang cawan untuk meratakan. Biarkan memadat, kemudian tuang lagi dengan 5 ml VRBA, dinginkan dan biarkan memadat. Lakukan duplo;
- c) jika pengkayaan diperlukan, tuangkan 8 ml sampai dengan 10 ml *tryptic soy agar* sebagai lapisan dasar dan kondisikan suhu  $48^{\circ}\text{C}$ . Goyang cawan hingga agar rata kemudian inkubasi pada suhu ruang selama  $(2 \pm 0,5)$  jam. Kemudian lapisi dengan 8 ml sampai dengan 10 ml VRBA cair kemudian diamkan hingga membeku dan memadat;
- d) balikkan cawan dan inkubasikan pada 18 jam sampai dengan 24 jam pada  $35^{\circ}\text{C}$ ;
- e) amati cawan di bawah penyorotan kaca pembesar. Hitung koloni warna ungu kemerahan yang berdiameter 0,5 mm atau lebih besar dan dikelilingi oleh gumpalan asam *bile*. Koloni cawan harus berjumlah sekitar 25 koloni sampai dengan 250 koloni. Kemudian dilanjutkan dengan uji penegasan untuk koloni yang positif;
- f) uji penegasan dilakukan dengan memindahkan sedikitnya 10 mata ose koloni yang mewakili, pindahkan masing-masing koloni ke dalam tabung BGLB *broth*;
- g) inkubasikan tabung pada  $35^{\circ}\text{C}$ . Amati setelah 24 sampai dengan 48 jam terhadap terbentuknya gas; dan
- h) tabung yang menghasilkan gas dianggap sebagai positif *Coliform*.

#### A.9.3.5 Perhitungan

$$\text{Coliform (koloni/g)} = n \times \frac{a}{b} \times F$$

##### Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g) yang diduga sebagai *Coliform*;
- a adalah jumlah koloni yang sudah ditegaskan sebagai *Coliform* (ditunjukkan dengan pembentukan gas pada tabung BGLB);
- b adalah jumlah koloni yang diambil dari koloni yang diduga sebagai *Coliform*;
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

#### A.9.3.6 Pernyataan hasil

##### A.9.3.6.1 Cara menghitung

Hitung koloni *Coliform* sesuai dengan A.9.2.6.1.

##### A.9.3.6.2 Cara membulatkan angka

Cara membulatkan angka pada hasil perhitungan *Coliform* sesuai dengan A.9.2.6.2.

#### A.9.4 *Escherichia coli*

##### A.9.4.1 Prinsip

Pertumbuhan *Escherichia coli* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung *Durham*, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

##### A.9.4.2 Peralatan

- a) Inkubator  $(35 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ , terkalibrasi;
- b) Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi,  $(45,5 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$ ;
- c) Rak untuk tabung reaksi;
- d) Pipet ukur 10 ml berskala 1 ml dan 1 ml berskala 0,1 ml steril;



- e) Botol pengencer terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir plastik;
- f) Tabung reaksi
- g) Tabung *Durham*;
- h) Cawan Petri gelas/plastik steril (ukuran 15 mm x 100 mm atau 15 mm x 90 mm); dan
- i) Jarum Ose, dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

#### A.9.4.3 Pembenihan, pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth / Lauryl tryptose (LT) broth*;
- b) *Brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %*;
- c) *Escherichia coli (EC) broth*;
- d) *Agar Levine's eosin methylene blue (L-EMB)*;
- e) *Plate count agar (PCA)*;
- f) *Gram stain*;
- g) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- h) Pereaksi Kovacs';
- i) *Methyl red – Voges Proskauer (MR – VP) broth*;
- j) Pereaksi *Voges Proskauer*;
- k) Larutan merah metil;
- l) *Koser's citrate broth*;
- m) *Peptone diluents 0,1 %*;
- n) Pereaksi indol;
- o) Larutan kalium hidroksida, KOH 40 %;
- p) *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*;
- q) Larutan *alfa naftol 5 %*; dan
- r) Kristal kreatin.

#### A.9.4.4 Cara kerja

##### A.9.4.4.1 APM – Uji pendugaan untuk *Escherichia coli*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.9.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  dan  $10^{-3}$ ) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth* yang didalamnya terdapat tabung *Durham* terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama  $(48 \pm 2)$  jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke -  $(24 \pm 2)$ . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi  $(48 \pm 2)$  jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

##### A.9.4.4.2 APM – Uji penegasan untuk *Escherichia coli*

- a) Pindahkan satu Ose dari setiap tabung *LST broth* yang positif ke dalam tabung *EC broth* yang berlainan,
- b) inkubasikan tabung-tabung *EC broth* tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $(45,5 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$ , tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan "positif",



- c) apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke -  $(48 \pm 2)$ . Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan "positif", dan
- d) lakukan uji lengkap terhadap semua tabung yang positif untuk uji penegasan.

#### A.9.4.4.3 APM – Uji lengkap untuk *Escherichia coli*

- a) Kocok tabung-tabung EC *broth* yang positif secara hati-hati,
- b) ambil koloni sebesar satu mata Ose, kemudian digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimal 0,5 cm,
- c) inkubasikan cawan agar L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ,
- d) periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna gelap dengan atau tanpa kilat logam,
- e) dari tiap cawan agar L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang diduga *E. coli* pada tabung agar miring PCA,
- f) inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$  dan gunakan untuk uji selanjutnya,
- g) buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E. coli* adalah gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti dibawah ini serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST *broth* untuk menegaskan adanya produksi gas,
  - uji indol
    - Inokulasi tabung *tryptophane broth*,
    - inkubasi selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$ ,
    - uji terbentuknya indol dilakukan dengan menambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml pereaksi Kovacs', dan
    - uji indol adalah positif bila terbentuk warna merah pada lapisan atas.
  - uji *Voges Proskauer*
    - Inokulasi tabung medium MR-VP *broth* dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$ ,
    - pindahkan 1 ml biakan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril,
    - tambahkan 0,6 ml larutan *alfa naftol* 5% dalam alkohol dan 0,2 ml larutan KOH 40% serta beberapa butir kristal kreatin, dan
    - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
  - uji merah metil
    - Setelah uji *Voges Proskauer*, inkubasikan kembali tabung MR-VP *broth* selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$ ;
    - tambahkan 5 tetes indikator merah metil pada setiap tabung, dan
    - uji merah metil adalah positif bila terbentuk warna merah dan negatif bila terbentuk warna kuning.
  - uji sitrat
    - Inokulasi tabung *Koser's citrate broth* dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan media. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain,
    - inkubasikan selama 96 jam pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$ , dan
    - uji sitrat adalah positif bila terbentuk kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dalam tabung.
  - Uji pembentukan gas dari *Lactose*
    - Inokulasikan tabung LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$ , dan
    - periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.



## A.9.4.4.4 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.1 - Reaksi biokimia *E. coli* pada uji IMVIC

<i>Escherichia coli</i>	Indol	Merah metil	<i>Voges Proskauer</i>	Sitrat
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

- a) Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila :
- uji IMVIC mengikuti pola + + - - atau - + - - sesuai dengan Tabel A.1,
  - pewarnaan gram menunjukkan gram negatif bentuk batang tidak berspora; dan
  - terbentuknya gas dalam LST *broth* dengan waktu inkubasi ( $48 \pm 2$ ) jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$
- b) Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung
- tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel A.2 – APM/g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/ml; 0,01 g/ml; dan 0,001 g/ml contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100



### A.9.5 *Salmonella* sp.

#### A.9.5.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

#### A.9.5.2 Peralatan

- a) Inkubator,  $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ;
- b) Inkubator *refrigerated* atau *laboratory refrigerator*,  $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$
- c) Otoklaf;
- d) Oven;
- e) Neraca, kapasitas 2 000 gram, dengan ketelitian 0,1 gram;
- f) Neraca, kapasitas 120 gram, dengan ketelitian 5 mg;
- g) Penangas air,  $(49 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;
- h) Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*,  $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ ;
- i) pH meter;
- j) Blender dengan kecepatan putaran 10 000 sampai dengan 12 000 rpm dan blender jar (botol) steril;
- k) Botol bertutup ulir bermulut lebar 500 ml steril, labu Erlenmeyer 500 ml steril, *beaker*, 250 ml steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- l) Pipet steril, 1 ml dengan ketelitian 0,01 ml; dan pipet steril 5 ml dan 10 ml dengan ketelitian 0,1 ml;
- m) Tabung reaksi atau tabung kultur steril, 10 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- n) *Beaker* plastik, 4 liter, dapat diotoklaf, untuk menyangga kantong plastik selama pengocokan dan inkubasi;
- o) Rak tabung reaksi atau rak tabung kultur;
- p) Vorteks *mixer*;
- q) Cawan Petri gelas/plastik (berukuran 15 mm x 100 mm) steril;
- r) *Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- s) Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- t) Jarum Ose, ujung runcing dan bulat (berukuran diameter 3 mm);
- u) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril;
- v) Lampu ( untuk mengamati reaksi serologi);
- w) *Fisher* atau *bunsen burner*, dan
- x) Kertas pH (kisaran pH 6 - 8) dengan ketelitian maksimum 0,4 unit pH per perubahan warna.

#### A.9.5.3 Pembenihan dan pereaksi

- a) *Tetrathionate* (TT) *broth*;
- b) *Rappaport-Vassiliadis* (RV) *medium* (RV *medium* harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi RV *medium* tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- c) *Xylose lysine desoxycholate* (XLD) *agar* (agar XLD);
- d) *Hektoen enteric* (HE) *agar* (agar HE);
- e) *Bismuth sulfite* (BS) *agar* (agar BS);
- f) *Triple sugar iron* (TSI) *agar* (agar TSI);



- g) *Tryptone ( atau tryptophane) broth* (TB);
- h) *Trypticase (tryptic) soy broth* (TSB);
- i) *Trypticase soy-tryptose broth* (TSTB);
- j) *Methyl red-Voges Proskeaur (MR-VP) broth*
- k) *Simmons citrate agar* (agar *Simmons citrate*);
- l) *Urea broth*;
- m) *Rapid urea broth*;
- n) *Malonate broth*;
- o) *Lysine iron agar* (LIA) (Edward dan Fife)
- p) *Lysine decarboxylase broth* (LDB);
- q) *Potassium cyanide* (KCN) *broth*;
- r) *Phenol red carbohydrate broth* (*Phenol red lactose broth* dan *Phenol red red sucrose broth*) atau *Purple carbohydrate broth* (*Purple lactose broth* dan *Purple sucrose broth*);
- s) *Phenol red dulcitol* atau *Purple broth base* dengan 0,5% *dulcitol*;
- t) *MacConkey agar* (agar *MacConkey*);
- u) *Brain heart infusion* (BHI) *broth*;
- v) *Tryptose blood agar base*;
- w) *Pereaksi Kovacs'*;
- x) *Pereaksi uji Voges-Proskauer* (VP);
- y) *Kristal keratin fosfat*;
- z) *Larutan kalium hidroksida* (KOH), 40 %;
- aa) *Larutan bromocresol purple dye*, 0,2 %;
- bb) *Indikator merah metil*;
- cc) *Indikator phenol red* atau *bromocresol purple*;
- dd) *Air suling steril*;
- ee) *Larutan physiological saline*, 0,85 % (steril);
- ff) *Larutan formanilized physiological saline*;
- gg) *Formanilized antigen*;
- hh) *Alfa naftol*;
- ii)  $K_2SO_3$ ;
- jj) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*;
- hh) *Salmonella polyvalent flagellar (H) antiserum*;
- ll) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*; dan
- mm) *Salmonella somatic group (O) antisera*: A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub>, F, G, H, I, Vi, atau kelompok lain yang sesuai.

#### A.9.5.4 Cara Kerja

##### A.9.5.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Siapkan larutan pengencer *trypticase soy broth* (TSB) dengan penambahan  $K_2SO_3$  (5 g  $K_2SO_3$  per 1 000 ml TSB, sehingga konsentrasi  $K_2SO_3$  sebesar 5 %). Tambahkan  $K_2SO_3$  ke dalam TSB, kemudian sterilisasikan 225 ml campuran TSB tersebut pada suhu 121 °C selama 15 menit;
- b) timbang 25 g contoh secara aseptis ke dalam botol pengencer 500 ml dan tambahkan 225 ml larutan pengencer steril serta campur sampai rata;
- c) biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup;
- d) Campur rata dengan cara diputar dan tentukan pH dengan kertas pH dan jika perlu, atur pH sampai (6,8 ± 0,2); dan
- e) kendurkan tutup wadah secukupnya ¼ putaran. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada 35 °C.



**A.9.5.4.2 Pengkayaan**

- Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- pipet 0,1 ml biakan pra-pengkayaan ke dalam 10 ml *Rappaport-Vassiliadis* (RV) medium dan 1 ml biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 ml *tetrathionate broth* (TT broth) dan vortex masing-masing campuran tersebut; dan
- inkubasikan media RV pada suhu  $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam dalam penangas air bersirkulasi dan TT broth pada  $(35 \pm 2,0) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam.

**A.9.5.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif**

- Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose 3 mm, goreskan biakan pengkayaan TT broth ke dalam cawan Petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan ditempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores;
- ulangi cara di atas dari media pengkayaan RV;
- inkubasikan cawan-cawan BS, HE dan XLD selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$ ;
- amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi  $(24 \pm 2)$  jam; Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah inkubasi  $(24 \pm 2)$  jam.

Morfologi koloni *Salmonella* sp. mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:

XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. Beberapa biakan *Salmonella* sp. memproduksi koloni kuning dengan atau tanpa inti hitam pada media XLD dan HE.

HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.

BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.

- jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media BS setelah inkubasi  $(24 \pm 2)$  jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama  $(24 \pm 2)$  jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media BS setelah inkubasi  $(48 \pm 2)$  jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut;
- dengan menggunakan jarum Ose ujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan ke dalam media agar miring TSI dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena *reaksi lysine decarboxylase* sangat anaerobik, agar miring LIA harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu  $(5 - 8) ^\circ\text{C}$ ;
- inkubasi agar miring TSI dan LIA pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya  $\text{H}_2\text{S}$  yang berlebihan. Pada TSI, biakan *Salmonella* sp. akan menghasilkan alkalin (merah) pada media agar miring dan asam (kuning) pada tusukan agar tegak, dengan atau tanpa memproduksi  $\text{H}_2\text{S}$  (warna kehitaman pada agar). Pada LIA, biakan *Salmonella* sp. akan menghasilkan reaksi alkalin (ungu) pada tusukan pada tabung agar tegak. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan negatif. Umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk  $\text{H}_2\text{S}$  pada LIA. Beberapa biakan non *Salmonella* sp. membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;



- h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA, tanpa memperhatikan reaksi TSI, akan dianggap sebagai *Salmonella* sp. dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang menghasilkan asam pada tusukan pada media agar tegak LIA dan alkalin pada agar miring serta reaksi asam pada tusukan pada media agar tegak TSI harus dipertimbangkan juga sebagai *Salmonella* sp. dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media agar tegak LIA dan asam pada agar miring TSI, serta reaksi asam pada tusukan di media agar tegak TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. Bila biakan TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* sp. (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari medium selektif yang tidak memberikan biakan duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA sesuai dengan pasal f di atas; dan
- i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
- tiga biakan presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BS) yang diinokulasi dari TT *broth*, dan tiga biakan presumtif yang diinokulasikan dari RV;
  - jika tiga biakan presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 biakan TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

#### A.9.5.5 Identifikasi *Salmonella* sp.

##### A.9.5.5.1 Biakan campuran

- a) Apabila biakan agar TSI terlihat tercampur, maka goreskan kembali kedalam media agar *MacConkey*, HE atau XLD. Inkubasi selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ . Amati koloni yang diduga *Salmonella* sp., yaitu:
- Agar *Mac Conkey*. Koloni tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* sp. akan membentuk area yang terang akibat pengendapan bakteri lain yang kadang-kadang tumbuh;
  - Agar *Hektoen Enteric* (HE). Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam;
  - Agar *Xylose Lysine desoxycholate* (XLD). Koloni merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media TSI dan LIA sesuai dengan A.9.5.4.3.f dan lanjutkan sesuai dengan A.9.5.4.3.g.

##### A.9.5.5.2 Biakan murni

- a) Uji urease (konvensional); dan  
Inokulasikan koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum ose runcing ke dalam tabung *urea broth*. Karena kadang-kadang tabung *urea broth* yang tidak diinokulasi biakan akan berubah warna menjadi merah keunguan (uji positif) maka perlu dibuat tabung *urea broth* tanpa inokulasi sebagai kontrol. Inkubasikan tabung-tabung tersebut selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ ; dan
- b) Uji urease (cepat).  
Inokulasikan koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum Ose 3mm ke dalam tabung *rapid urea broth*. Inokulasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu  $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ . Biakan *Salmonella* sp. akan memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna) pada uji urease, walaupun demikian perlu uji lebih lanjut.



#### A.9.5.5.3 Pengujian biakan urease negatif

- a) *Lysine Decarboxylase Broth* (LDB);  
Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 Ose koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari agar miring TSI dan inokulasikan ke dalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$ , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* sp. memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2% *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.
- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5% *dulcitol*; dan inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$ , tetapi amati setelah inkubasi 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung *Durham* dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- c) *Tryptone* (atau *tryptophane*) *broth* (TB);  
Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$  dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:
  - *Potassium Cyanide* (KCN) *broth*  
Pindahkan 1 Ose biakan dari TB 24 jam ke dalam media KCN *broth*. Tutup tabung rapat-rapat (bila perlu lapisi dengan parafin/lilin). Inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$  tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella* sp. tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.
  - *Malonate broth*  
Pindahkan 1 Ose dari biakan TB ke dalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$ , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.
  - Uji indol  
Dari media TB yang tersisa, tambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml pereaksi *kovacs*'. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.  
Nyatakan biakan sebagai bukan *Salmonella* sp. bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif.

#### A.9.5.5.4 Uji serologi *polyvalent flagellar* (H)

- a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan reaksi urease negatif kedalam:
  - BHI *broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$  sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau
  - *Trypticase Soy Tryptose broth* (TSTB) dan inkubasi selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$  (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 ml larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 ml biakan di atas.
- b) siapkan 2 biakan dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera.



Masukkan  $\pm 0,5$  ml larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 ml antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 ml *formanilized physiological saline* dengan 0,5 ml *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C sampai dengan 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.

- Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
- negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol; dan
- non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

#### A.9.5.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic* (o)

- a) Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 ml 0,85% *saline* menggunakan jarum Ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- d) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (o) *antiserum* ke dalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- f) klasifikasi uji *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
  - Positif : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
  - negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*;
  - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

#### A.9.5.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella* sp., biakan yang memberikan reaksi yang khas sesuai dengan Tabel A.3 pasal 1 - 11. Jika 1 biakan TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella* sp., uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Biakan yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* sp. pada uji biokimia, harus dimurnikan sesuai dengan A.9.5.5.1 diatas dan uji kembali sesuai dengan A.9.5.5.2.

Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap biakan yang tidak memberikan reaksi yang khas sesuai dengan Tabel A.3:

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
  - Inokulasi broth ini dengan biakan TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama (48  $\pm$  2) jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam;
  - nyatakan positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung *Durham*. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;
  - jika biakan memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp., kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi alkalin pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.
- b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;



Ikuti prosedur sesuai dengan A.9.5.5.6.a. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. pada biakan yang memberikan reaksi positif, kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;

c) *Methyl Red-Voges-Proskauer* (MR-VP) *broth*;

Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$ ;

Lakukan uji *Voges-Proskauer* (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :

- Pindahkan 1 ml MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$ ;
- Tambahkan 0,6 ml alfa naftol dan aduk;
- Tambahkan 0,2 ml larutan KOH 40% dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam; dan
- Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi VP negatif.

Uji merah metil (MR)

- Tambahkan 5 tetes indikator merah metil ke dalam media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam;
- amati hasilnya dengan segera; dan
- umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif.

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.

d) *Agar Simmons citrate*.

- Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring. Inkubasikan selama  $(96 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$ ;
- nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil sitrat positif;
- negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

#### A.9.5.6 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* sp. biakan-biakan yang mempunyai reaksi sesuai dengan Tabel A.3. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan-biakan yang memberikan reaksi sesuai dengan Tabel A.4. Bila tidak ada 1 biakan TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* sp. pada uji biokimia, lakukan uji biokimia sesuai dengan A.9.5.5.3 terhadap biakan yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

**Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella* sp.**

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp. sp. reaksi species <sup>a</sup>
		Positif	Negatif	
1.	<i>Glucose</i> (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2.	<i>lysine decarboxylase</i> (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3.	H <sub>2</sub> S (TSI dan LIA)	hitam	tidak hitam	+
4.	Urease	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5.	<i>Lysine decarboxy broth</i>	warna ungu	warna kuning	+



6.	<i>Phenol red dulcitol broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ <sup>b</sup>
7	KCN <i>broth</i>	pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8	<i>Malonate broth</i>	warna biru	tidak berubah warna	- <sup>c</sup>
9	Uji <i>indole</i>	permukaan berwarna violet	permukaan berwarna kuning	-

Tabel A.3 (lanjutan)

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp. sp. reaksi species <sup>a</sup>
		Positif	Negatif	
10	Uji <i>Polyvalent flagellar</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
11	Uji <i>Polyvalent somatic</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
12	<i>Phenol red lactose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- <sup>c</sup>
13	<i>Phenol red sucrose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14	Uji <i>Voges-Proskauer</i>	merah muda sampai merah	tidak berubah warna	-
15	Uji <i>methyl red</i>	merah menyebar	kuning menyebar	+
16	<i>Simmons citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V
<b>Keterangan:</b> <sup>a</sup> + adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari; - adalah 90% atau lebih negatif dalam satu atau dua hari; V adalah variabel; <sup>b</sup> adalah mayoritas dari kultur <i>Salmonella arizonae</i> : negatif; <sup>c</sup> adalah mayoritas dari kultur <i>Salmonella arizonae</i> : positif.				

Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella* sp.

No	Substrat uji	Hasil
1	<i>Urease</i>	positif (warna ungu-merah)
2	Uji <i>indole</i> dan <i>polivalent flagellar</i> (H)	positif (permukaan warna violet) negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>Lysine decarboxylase</i> dan KCN <i>broth</i>	positif (ada pertumbuhan) negatif (warna kuning)
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) <sup>a,b</sup>
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) <sup>b</sup>
6	KCN <i>broth</i> , uji <i>Voges-Proskauer</i> , dan <i>methyl red</i>	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)
<b>Keterangan:</b> <sup>a</sup> adalah test <i>malonate broth</i> lebih lanjut pada biakan yang positif untuk menentukan <i>Salmonella arizonae</i> <sup>b</sup> adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella</i> sp., uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella</i> sp..		



**A.9.6 *Bacillus cereus*****A.9.6.1 Prinsip**

Pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* (*B. cereus*) ditandai dengan terbentuknya koloni eosin merah muda penghasil *lechitinase*, yang diikuti dengan uji penegasan pada berbagai media.

**A.9.6.2 Peralatan**

- a) Inkubator ( $30 \pm 2$ ) °C dan ( $35 \pm 2$ ) °C, terkalibrasi;
- b) Alat homogenisasi yang sesuai dengan kecepatan putaran 18 000 rpm sampai dengan 21000 rpm;
- c) Penangas air, (48 – 50) °C;
- d) Mikroskop, *microscop slide* dan *cover slip*;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) *Vorteks mixer*;
- g) Pembakar *Bunsen* ;
- h) Rak tabung biakan;
- i) Botol, steril;
- j) Tabung anaerobik *GasPak* dilengkapi dengan  $H_2 + CO_2$  *generator envelopes* dan katalisnya;
- k) Tabung biakan, (ukuran 13 mm x 100 mm), steril;
- l) Pipet ukur 10 ml, 5 ml dan 1 ml berskala 0,1 ml steril;
- m) Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril;
- n) Batang penyebar steril, diameter 3 mm sampai dengan 4 mm dengan area penyebar 45 mm sampai dengan 55 mm;
- o) Jarum Ose, berukuran 2 mm dan 3 mm; dan
- p) Pena penanda.

**A.9.6.3 Media dan pereaksi**

- a) Agar *Mannitol-egg yolk-polymyxin* (MYP);
- b) *Egg yolk emulsion*, 50%;
- c) *Trypticase soy-polymyxin broth*;
- d) Larutan polimiksin B untuk *MYP agar* (0,1%) dan *trypticase soy-polymyxin broth* (0,15 %);
- e) Lisozim 0,001 %;
- f) *Phenol red glucose broth*;
- g) Agar tirosin;
- h) *Lysozyme broth*;
- i) Media *Voges-Proskauer*;
- j) *Nutrient broth*;
- k) *Nitrate broth*;
- l) *Nutrient agar* (NA) untuk *B. cereus*;
- m) Pereaksi *sulfanilic acid*;
- n) Pereaksi alfa naftol;
- o) *Butterfield's phosphate-buffered dilution water* (BPB) yang disterilkan dalam botol dengan volume akhir ( $450 \pm 5$ ) ml dan ( $90 \pm 2$ ) ml;
- p) Pereaksi uji *Voges-Proskauer*;
- q) Larutan kadium hidroksida, KOH 40 %;
- r) Kristal kreatin; dan
- s) Metanol.



**A.9.6.4 Persiapan contoh**

- timbang 50 g contoh ke dalam blender yang bersih dan steril secara aseptik,. Tambahkan 450 ml *butterfield's phosphate-buffered dilution water* (1 : 10) dan kocok selama 2 menit pada kecepatan tinggi (18 000 rpm sampai dengan 21 000 rpm); dan
- buat seri pengenceran dengan menggunakan larutan BPB (1:10).

**A.9.6.5 Penetapan *B. cereus*****A.9.6.5.1 APM - *B. cereus***

- Teknik APM direkomendasikan untuk menghitung *B.cereus* dalam contoh yang diharapkan mengandung *B. cereus* lebih kecil dari 10 per gram contoh;
- inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  dan  $10^{-3}$ ) ke dalam tiga tabung *trypticase soy-polymyxin broth*;
- inkubasikan tabung-tabung tersebut dalam inkubator pada suhu 30 °C selama (48 ± 2) jam;
- amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke-(48 ± 2) untuk melihat pertumbuhan bakteri *B. cereus*;
- gores biakan dari tabung yang positif dengan Ose ke dalam media agar MYP dan inkubasi selama 24 jam sampai dengan 48 jam pada suhu 30 °C;
- ambil 1 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan *lechitinase* positif dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk uji penegasan *B.cereus* sesuai dengan A.9.5.6; dan
- hitunglah APM *B. cereus* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung-tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *B. cereus*.

**A.9.6.5.2 Angka Lempeng Total - *B. cereus***

- Buat tingkat pengenceran dari  $10^{-2}$  sampai dengan  $10^{-6}$  dengan memindahkan 10 ml contoh yang telah dihomogenkan ke dalam 90 ml larutan pengencer, aduk dengan kuat dan lanjutkan ke pengenceran  $10^{-6}$ ;
- inokulasi sebanyak 0,1 ml masing-masing tingkat pengenceran (termasuk 1:10) menggunakan batang penyebar steril di atas permukaan media agar MYP, lakukan secara duplo;
- inkubasi media agar MYP pada suhu 30 °C selama 24 jam;
- amati koloni yang dikelilingi oleh zona endapan yang menunjukkan bahwa *B. cereus* menghasilkan *lecithinase* berwarna merah muda. Warnanya akan menjadi lebih jelas apabila inkubasi dilanjutkan;
- jika warna merah muda tidak jelas, lanjutkan inkubasi selama 24 jam lagi sebelum perhitungan koloni;
- pilih media yang mengandung 15 koloni sampai dengan 150 koloni eosin merah muda penghasil *lecithinase*;
- beri tanda di bagian dasar cawan Petri berdasarkan zona yang terbentuk menggunakan pena penanda untuk memudahkan perhitungan dan penjumlahan koloni *B. cereus*;
- ambil 5 atau lebih koloni yang positif mengandung *B. cereus* dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk uji penegasan *B.cereus* sesuai dengan A.9.6.6; dan
- hitung jumlah *B.cereus* per gram contoh berdasarkan persentase koloni yang telah diuji dan ditegaskan sebagai *B. cereus*.



$$B. cereus \text{ (koloni/g)} = n \times \frac{a}{b} \times F \times 10$$

**Keterangan:**

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
- a adalah jumlah koloni yang sudah ditegaskan sebagai *B.cereus*;
- b adalah jumlah koloni yang diambil dari koloni yang positif *B.cereus*;
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai;
- 10 adalah faktor pengenceran dari jumlah contoh yang diinokulasi (0,1 ml).

**Contoh perhitungan:**

Jika jumlah rata-rata yang diperoleh pada pengenceran  $10^{-3}$  adalah 65 dan 4 dari 5 koloni telah diuji dan dinyatakan sebagai *B. cereus* maka jumlah sel *B.cereus* per gram contoh adalah :

$$B. cereus \text{ (koloni/g)} = 65 \times \frac{4}{5} \times 1\,000 \times 10$$

$$B. cereus \text{ (koloni/g)} = 520.000$$

**A.9.6.6 Uji penegasan untuk *B. cereus*****A.9.6.6.1 Biakan campuran**

- a) Ambil 5 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan *lechitinase* positif dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk uji penegasan *B.cereus*;
- b) inkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C;
- c) lakukan pengamatan secara mikroskopis, disertai pewarnaan gram. *B. cereus* akan tampak berbentuk batang besar, gram positif, dengan rantai pendek hingga panjang, spora berbentuk ellips, letaknya ditengah sampai sub terminal dan spora tersebut tidak menggembungkan sporangium;
- d) pindahkan biakan dengan ose 3 mm dari setiap media miring NA ke tabung (13 x 100) mm yang mengandung 0,5 ml BPB kemudian dikocok dengan *vorteks*, untuk mensuspensikan biakan; dan
- e) suspensi biakan ini digunakan untuk uji penegasan *B. cereus* berikut:

**A.9.6.6.2 Uji *phenol red glucose broth***

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan menggunakan Ose 2 mm ke dalam 3 ml *phenol red glucose broth* dalam tabung;
- b) inkubasi tabung tersebut secara anaerobik selama 24 jam pada suhu 35 °C dalam tabung anaerobik GasPak; dan
- c) kocok tabung tersebut dengan kuat dan amati pertumbuhan *B.cereus* yang ditandai oleh peningkatan kekeruhan dan perubahan warna dari merah ke kuning yang menunjukkan bahwa asam telah dihasilkan secara anaerobik dari glukosa. Perubahan warna dari merah ke orange/kuning bisa terjadi pada sebagian tabung kontrol yang tidak diinokulasi. Hal ini disebabkan oleh terjadinya pengurangan pH akibat pemaparan media oleh CO<sub>2</sub> yang terbentuk dalam tabung anaerobik GasPak. Gunakan kontrol positif dan kontrol negatif untuk menyakinkan perbedaan antara reaksi positif dan positif palsu.

**A.9.6.6.3 Uji *nitrate broth***

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan menggunakan Ose 3 mm ke dalam 5 ml *nitrate broth* dalam tabung;
- b) inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35 °C;



- c) untuk uji nitrit, tambahkan 0,25 ml masing-masing pereaksi *sulfanilic acid* dan pereaksi *alfa naftol* ke dalam setiap tabung; dan
- d) warna oranye yang terbentuk dalam 10 menit menunjukkan bahwa nitrat telah direduksi menjadi nitrit.

#### A.9.6.6.4 Uji media modified VP

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan menggunakan Ose 3 mm ke dalam 5 ml media VP dalam tabung;
- b) inkubasi tabung tersebut selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ ;
- c) untuk uji terbentuknya *acetylmethyl-carbinol*, pipet 1 ml biakan ke dalam tabung uji (16 x 125) mm, tambahkan 0,6 ml larutan *alfa naftol*, dan 0,2 ml KOH 40 %;
- d) aduk dan tambahkan sedikit kristal kreatin;
- e) amati setelah didiamkan selama 1 jam pada suhu ruang; dan
- f) uji positif apabila terbentuk warna merah muda atau violet.

#### A.9.6.6.5 Uji agar tirosin

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan ose 3 mm ke seluruh permukaan media miring agar tirosin;
- b) inkubasi media miring tersebut selama 48 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ ;
- c) amati zona bening sekitar pertumbuhan bakteri yang terbentuk yang menunjukkan bahwa tirosin telah terdekomposisi; dan
- d) jika hasil uji adalah negatif maka inkubasi dilanjutkan sampai total selama 7 hari sebelum hasil dinyatakan negatif.

#### A.9.6.6.6 Uji *lysozyme broth*

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm ke dalam 2,5 ml *nutrient broth* yang mengandung lisozim 0 001% dalam tabung;
- b) inokulasikan juga suspensi biakan ke dalam 2,5 ml *nutrient broth* sebagai kontrol positif;
- c) inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ ;
- d) uji amati pertumbuhan dalam *lysozyme broth* dan dalam kontrol *nutrient broth*; dan
- e) inkubasi tabung yang negatif selama 24 jam lagi sebelum dibuang.

#### A.9.6.6.7 Uji agar MYP

- a) Uji ini tidak diperlukan apabila hasil uji telah jelas dengan menggunakan media agar MYP dan tidak ada gangguan dari mikroorganisme yang lain;
- b) bagi bagian dasar cawan Petri menjadi 6 bagian sampai dengan 8 bagian yang sama menggunakan pena penanda;
- c) inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm disetiap bagian agar MYP tersebut dengan cara menyentuh permukaan agar MYP secara hati-hati. Dalam satu cawan Petri dapat diuji 6 atau lebih biakan;
- d) biarkan inokulum diserap sempurna sebelum diinkubasikan selama 24 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ ;
- e) amati terbentuknya *lecithinase* yang ditunjukkan oleh zona presipitasi disekitar pertumbuhan;
- f) manitol tidak difermentasi oleh isolat jika media tempat tumbuh dan sekitarnya berwarna eosin merah muda. Warna kuning menunjukkan bahwa asam terbentuk dari manitol; dan
- g) koloni *B. cereus* biasanya positif *lecithinase* dan negatif mannitol pada agar MYP.



**A.9.6.6.8 Hasil uji penegasan *B. cereus***

Hasil uji penegasan menunjukkan sebagai *B. cereus* apabila:

- Menghasilkan gram positif dengan spora yang tidak sebesar sporangium;
- menghasilkan *lecithinase* dan tidak memfermentasikan manitol dalam media agar MYP; tumbuh dan menghasilkan asam dari glukosa secara anaerobik;
- mereduksi nitrat menjadi nitrit;
- menghasilkan *acetylmethylcarbinol*;
- menguraikan L-tirosin; dan
- tumbuh dalam media yang mengandung lisozim 0 001%.

**A.9.7 *Clostridium perfringens*****A.9.7.1 Prinsip**

Pertumbuhan *Clostridium perfringens* (*C. Perfringens*) yang dapat mereduksi sulfit pada media selektif yang dicirikan oleh terbentuknya koloni berwarna hitam dan yang dilanjutkan dengan uji penegasan.

**A.9.7.2 Perbenihan, pengencer dan pereaksi**

- Peptone dilution water*;
- Nitrite test reagent A*;
- Nitrite test reagent B*;
- Buffered glycerol salt solution*;
- TSC agar (Tryptose sulfite cycloserine)*;
- D- Cycloserine solution*;
- Egg yolk emulsion*;
- Buffered motility nitrate medium*;
- Lactose-gelatin medium*;
- Sporulation broth*;
- Polypeptone yeast ekstrak (PY) medium*; dan
- Fluid thioglycollate medium*.

**A.9.7.3 Peralatan**

- Inkubator ( $35 \pm 1$ ) °C terkalibrasi;
- Alat homogenisasi yang sesuai dengan kecepatan rendah 13 000 rpm;
- Alat penghitung koloni;
- Tabung anaerobik, disarankan menggunakan BBL *GasPak* dilengkapi dengan H + CO<sub>2</sub> *generator envelopes*;
- Pipet ukur 10 ml berskala 1 ml dan 1 ml berskala 0,1 ml steril;
- Tabung reaksi 150 x 16 mm, 125 x 16 mm, 100 x 15 mm; dan
- Cawan Petri.

**A.9.7.4 Cara kerja****A.9.7.4.1 Uji pendugaan untuk *C. perfringens***

- Timbang 50 g contoh ke dalam blender yang steril secara aseptik. Tambahkan 450 ml *peptone dilution water* dan homogenisasikan selama 2 menit pada kecepatan rendah (13 000 rpm);



- b) buat tingkat pengenceran  $10^{-2}$  sampai  $10^{-6}$  menggunakan larutan pengencer *peptone dilution water*. Contoh: untuk  $10^{-2}$  : pindahkan 10 ml pengenceran  $10^{-1}$  ke dalam 90 ml *peptone dilution water*;
- c) tuang masing-masing 5 ml TSC agar ke dalam 10 cawan Petri, sebarkan dengan cepat dan ratakan;
- d) pada saat agar telah membeku, pipet secara aseptik 1 ml contoh yang telah homogen dari masing-masing pengenceran secara duplo pada bagian tengah cawan Petri;
- e) tuangkan kembali 15 ml TSC Agar tanpa *egg yolk* ke dalam Petri. Campur dengan baik dan putar dengan hati-hati;
- f) atau dengan cara lain, dengan menggunakan tangkai penyebar, sebarkan 0,1 ml contoh diatas cawan Petri yang berisi medium TSC Agar yang mengandung *egg yolk* ;
- g) biarkan medium menyerap contoh 5 – 10 menit, kemudian lapisi dengan 10 ml TSC agar lagi, tanpa *egg yolk*;
- h) pada saat agar telah membeku, tempatkan cawan Petri didalam anaerobik jar. Kondisi diusahakan anaerobik dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 20 jam untuk TSC Agar tanpa *egg yolk* dan 35 °C selama 24 jam untuk TSC Agar dengan *egg yolk*;
- i) setelah inkubasi selesai, pindahkan cawan Petri dari jar dan amati secara visual untuk pertumbuhan dan adanya koloni berwarna hitam;
- j) pilih cawan cawan Petri yang menunjukkan perkiraan 20 koloni sampai 200 koloni hitam, dan hitung jumlah *Clostridium sp/gr* contoh; dan
- k) *Clostridium perfringens* di dalam medium yang mengandung *egg yolk* berwarna hitam dan biasanya disekelilingnya memiliki zona putih sepanjang 2 mm sampai 4 mm sampai mempunyai aktifitas lesitin. Akan tetapi beberapa strain lemah atau negatif lesitin.

#### A.9.7.4.2 Uji Penegasan untuk *C. perfringens*

- a) Pilih 10 koloni dari cawan Petri yang mengandung (20 – 200) koloni, inokulasikan masing-masing ke dalam tabung *Fluid thioglycollate medium* dan inkubasikan selama 18 jam sampai 24 jam pada suhu 35 °C;
- b) buat pewarnaan gram dari kultur *Fluid thioglycollate medium* dan cek kemurniannya. *Clostridium perfringens* mempunyai bentuk batang pendek, tebal, gram positif;
- c) gores kultur dari TSC Agar yang mengandung *egg yolk* dan inkubasikan cawan Petri pada suasana anaerobik selama 24 jam pada suhu 35 °C untuk mendapatkan kultur murni;
- d) inokulasikan dengan cara menusuk bagian tegak pada *Buffered motility nitrate* dan *Lactose-gelatin medium* sepanjang 2 mm dari kultur *Fluid thioglycollate* atau yang diisolasi dari TSC agar;
- e) inokulasikan 1 ml pada *sporulation broth* yang diambil dari *Fluid thioglycollate medium* dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- f) uji tabung-tabung *Buffered motility nitrate medium* dengan lampu pemancar untuk melihat pertumbuhan sepanjang tusukan. *Clostridium perfringens* adalah organisme non motil, tumbuh hanya didalam dan sepanjang garis tusukan, sedangkan organisme motil tumbuh menyebar keluar di dalam medium menjauhi tusukan;
- g) uji *Buffered Motility nitrat medium* untuk adanya reduksi nitrat, dengan menambahkan 0,5 ml *nitrite test reagent A* dan 0,2 ml *nitrite test reagent B*. Warna oranye dalam waktu 15 menit menunjukan adanya nitrat, jika tidak ada perubahan warna tambahkan beberapa butir serbuk Zn dan tunggu 10 menit. Jika tetap tidak ada perubahan warna setelah ditambahkan serbuk Zn menunjukan bahwa semua nitrat telah tereduksi. Perubahan menjadi warna oranye menunjukan bahwa organisme tidak mampu mereduksi nitrat;
- h) uji *Lactose-gelatin medium* untuk timbulnya gas dan perubahan warna dari merah menjadi kuning, menunjukan bahwa laktosa difermentasi dengan memproduksi asam. Dinginkan tabung selama 1 jam pada 5 °C dan cek adanya pencairan gelatin (*gelatin liquefaction*). Jika media membeku, inkubasi kembali selama 24 jam pada 35 °C dan ulangi uji *gelatin liquefaction*;



- i) buat pewarnaan gram dari *sporulation broth* dan uji secara mikroskopik untuk sporanya. Jika tidak terbentuk spora, maka laporkan tidak memproduksi spora. Simpan kultur spora pada 4 °C jika ingin menguji lebih lanjut;
- j) identifikasi sebagai *Clostridium perfringens* apabila bakteri non motil, b, bakteri gram positif, memproduksi koloni berwarna hitam pada TSC agar, mereduksi nitrat menjadi nitrit, memproduksi asam dan gas dan mencairkan gelatin dalam waktu 48 jam.

#### A.9.7.5 Perhitungan

Hitung Jumlah *Clostridium perfringens* di dalam contoh uji dengan dasar persentase (%) dari koloni yang betul-betul *C. perfringens*.

$$C. perfringens \text{ (koloni/g)} = n \times \frac{a}{b} \times F$$

##### Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g) yang diduga sebagai *Clostridium perfringens*;
- a adalah jumlah koloni yang sudah ditegaskan sebagai *Clostridium perfringens*;
- b adalah jumlah koloni yang diambil dari koloni yang diduga sebagai *Clostridium perfringens*;
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

Contoh perhitungan:

Jika jumlah rata-rata yang diperoleh pada pengenceran  $10^{-4}$  adalah 85 koloni yang diduga *C. perfringens* dan 8 koloni dari 10 koloni telah diuji dan ditegaskan sebagai *C. perfringens* maka jumlah sel *C. perfringens* per gram contoh adalah :

$$C. perfringens \text{ (koloni/g)} = 85 \times \frac{8}{10} \times 10.000$$

$$C. perfringens \text{ (koloni/g)} = 680.000$$

#### A.9.8 Kapang dan khamir

##### A.9.8.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dan khamir dalam media yang sesuai setelah diinkubasi pada suhu  $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 5 hari.

##### A.9.8.2 Peralatan

- a) Inkubator  $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , terkalibrasi;
- b) Otoklaf;
- c) Penangas air  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;
- d) pH meter;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) *Tally register*;
- g) Pipet ukur 10 ml dan 1 ml, steril;
- h) Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- i) *Bent glass rod*.

##### A.9.8.3 Pembenihan, pengencer dan pereaksi

- a) Agar *dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC);
- b) Agar *dichloran 18% glycerol* (DG 18);
- c) Larutan pepton 0,1%
  - pepton 1 g



- Air suling 1 000 ml

Larutkan pepton dalam air suling kemudian sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C dan atur pH sehingga mencapai pH akhir ( $7,0 \pm 0,2$ ).

d) Larutan antibiotik:

Antibiotik ditambahkan di media kapang untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil saat diotoklaf. Konsentrasi antibiotik yang diizinkan adalah 100 mg per liter media. Jika tampak pertumbuhan bakteri, siapkan media dengan penambahan 50 mg per liter *chloramphenicol* sebelum otoklaf dan 50 mg per liter *chlortetracycline* steril saat media mulai di kondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

#### A.9.8.4 Persiapan dan Homogenisasi Contoh

- a) Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 ml larutan pepton 0,1% steril sehingga diperoleh pengenceran 1 : 10; dan
- b) Kocok campuran beberapa kali hingga homogen

#### A.9.8.5 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran dari  $10^{-2}$  sampai dengan  $10^{-6}$  dengan menggunakan larutan pepton 0,1%
- b) persiapan media dalam cawan dapat dilakukan dengan salah satu metode di bawah ini, yaitu :
  - metode sebar (media DRBC atau DG 18), penggunaan media DG 18 lebih sesuai untuk contoh uji yang mempunyai aw kurang dari 0,95: pipet 0,1 ml masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media padat dan sebarkan merata dengan menggunakan *bent glass rod*.
  - metode tuang (media DG 18):
    - pipet 1,0 ml masing-masing pengenceran ke dalam cawan Petri dan sesegera mungkin tuangkan 20 ml sampai dengan 25 ml media;
    - campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam selama 1 menit sampai dengan 2 menit; dan
    - biarkan hingga campuran dalam cawan Petri memadat.
- c) masukkan semua cawan Petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator dan inkubasi pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari. Jangan menumpuk cawan lebih dari 3 tumpukan. Biarkan cawan dan jangan merubah posisinya;
- d) hitung koloni pada cawan setelah 5 hari inkubasi. Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu selama 48 jam. Jangan menghitung koloni dalam cawan sampai batas waktu inkubasi berakhir, karena merubah posisi cawan dapat mengakibatkan pertumbuhan sekunder spora; dan
- e) nyatakan hasil perhitungan sebagai koloni per gram contoh.

#### A.9.8.6 Pernyataan hasil

##### A.9.8.6.1 Cara menghitung

Hitung koloni kapang dan khamir sesuai dengan A.9.2.6.1 untuk cawan yang berisi 10 koloni sampai dengan 150 koloni.

##### A.9.8.6.2 Cara membulatkan angka

Cara membulatkan angka pada hasil perhitungan kapang dan khamir sesuai dengan A.9.2.6.2.



## Bibliografi

- American Oil Chemists' Society. 1993. *AOCS Official Method Ca 5a-40, Free Fatty Acids*. 4<sup>th</sup> Edition.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 935.29, Moisture in Malt, Gravimetric Method*. 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 27.3.06.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 941.12, Ash of Spices, Ash Insoluble in Acid*. 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 43.1.05.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 948.22, Fat (Crude) in Nuts and Nut Products, Gravimetric Method*. 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 40.1.05.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 974.14, Mercury in Fish, Alternative Digestion Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.24
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 976.30, Clostridium perfringens, Microbiological Method, Method*, 18<sup>th</sup> edition, Chapter 17.7.02.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.35.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods: Atomic Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.09.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Bacillus cereus*. Chapter 14.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Mold, Yeast and Mycotoxin*. Chapter 18.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2006. *Salmonella*. Chapter 5.
- SNI 7387 : 2009. *Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan*.
- SNI 7388 : 2009. *Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan*.